



TITLE:

Two consecutive nucleotide substitutions of the T3 receptor β gene resulting in an 11-amino acid truncation in a patient with generalized resistance to thyroid hormone(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Miyoshi, Yoji

CITATION:

Miyoshi, Yoji. Two consecutive nucleotide substitutions of the T3 receptor β gene resulting in an 11-amino acid truncation in a patient with generalized resistance to thyroid hormone. 京都大学, 1997, 博士(医学)

ISSUE DATE:

1997-03-24

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/202163>

RIGHT:

氏 名	三 好 洋 二
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 1846 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Two consecutive nucleotide substitutions of the T3 receptor β gene resulting in an 11-amino acid truncation in a patient with generalized resistance to thyroid hormone (全身型甲状腺ホルモン不応症患者より得た二塩基連続の遺伝子変異により C 末端11個のアミノ酸が欠失した異常 T3 レセプター β の機能解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 森 徹 教 授 清 野 裕 教 授 中 尾 一 和

論 文 内 容 の 要 旨

甲状腺ホルモン (T3) は生体の恒常性, 組織における代謝調節並びに細胞の増殖, 分化等多彩な生理作用を有している。T3 は細胞核内の遺伝子プロモーター上にあらかじめ結合していると思われる T3 レセプター (TR) と結合することによって, その生理活性を発揮すると考えられている。TR の機能を研究するうえで有用な疾患に甲状腺ホルモン不応症 (RTH) がある。RTH は組織の甲状腺ホルモンに対する反応性が著明に低下した先天性遺伝性疾患であり, その病因として TR β 1 遺伝子の異常が同定されている。その遺伝子異常のほとんどは点突然変異で, TR β 1 のホルモン結合領域に集中している。今回我々は, 知能障害および言語発育の遅延を伴い臨床的に重篤な RTH と診断された患者より得た遺伝子を用い, 分子生物学的検討を行った。

I : TR β 1 遺伝子異常の検索とその発現

患者の皮膚繊維芽細胞からゲノム DNA を抽出し TR β 1 のエクソン 5 から 10 をそれぞれ PCR 法で増殖した。 λ -exonuclease を用い一本鎖 DNA 調整しダイレクトシーケンスを行った。その結果, エクソン 10 に含まれる 1637 番目のチミンがアデニンに, 1638 番目のシトシンがアデニンに重複点突然変異していた。このため 451 番目のアミノ酸であるフェニルアラニンがストップコドンに変化していた。以上の結果より, TO β 1 遺伝子の C 末端の 11 個のアミノ酸が欠失している可能性等が推定された。TR β 1 の N 末端 73 から 93 番目のアミノ酸を認識する抗体を用いたウエスタンブロットによる検討を行うと, C 端 11 アミノ酸の欠失した異常 TR は正常 TR よりも電気泳動度の速いバンドとして検出された。

II : 同定した異常 TR β 1 の機能解析

本症例の重篤な病態と TR 遺伝子変異の関連を検討するために異常 TR の機能解析を行った。1) Cop-7 細胞に発現させた異常 TR β 1 の T3 結合能はその親和定数が正常 TR に比べ, 著明に低下してい

た。2) この異常 $TR\beta 1$ と T3 レスポンスエレメント (TRE) を含むレポーター遺伝子を, CV-1 細胞に transfect し転写活性を調べると, T3 を高濃度 ($1\ \mu\text{M}$) にした場合でも転写活性はまったく検出されなかった。3) 正常 $TR\beta 1$ による T3 依存性の転写活性を阻害する強さ, すなわち dominant negative 作用は非常に強く, 等モルの異常 $TR\beta 1$ を共に transfect することにより, 正常 $TR\beta 1$ による転写活性が半分以上に阻害された。4) TR は T3 非存在下時にはプロモーターの転写活性をむしろ積極的に阻害する (サイレンシング) ことが知られている。CV-1 細胞に発現させたレポーター遺伝子のプロモーター活性は, 異常 $TR\beta 1$ を共に発現させることにより著明に阻害された。この阻害作用は正常 $TR\beta 1$ を用いた場合に比べて有意に強かった。ゲルシフトアッセイにより TR の DNA 結合力を検討すると, T3 非存在下において正常 $TR\beta 1$ と異常 $TR\beta 1$ の間には TRE に対する結合能に有意の差は認められなかった。よって, 異常 $TR\beta 1$ の強力なサイレンシング作用は TRE への結合力に依らない未知の因子が関与しているものと思われた。

臨床的に重篤な甲状腺ホルモン不応症患者より同定された $TR\beta 1$ 遺伝子は重複点突然変異を有し, これは RTH としては世界で最初の症例である。 $TR\beta 1$ の C 端 11 個のアミノ酸が欠失したこの異常 TR は, T3 結合能と転写活性が完全に欠如しており, 正常 TR による転写活性並びにプロモーター活性を強く阻害した。これらのことにより, $TR\beta 1$ の機能における C 末端領域の重要性が示唆された。 TR の末端 9 個のアミノ酸の欠失した癌遺伝子 *v-erbA* にも, 同様の阻害作用を有することが知られており, このことが患者の臨床症状の重篤さと関連している可能性が示唆された。

以上, 重複点突然変異による $TR\beta 1$ の C 端 11 アミノ酸の欠失を起こす RTH の $TR\beta 1$ 遺伝子異常と異常 $TR\beta 1$ の機能解析を行った。

論文審査の結果の要旨

甲状腺ホルモン不応症 (RTH) は甲状腺ホルモンの作用機構の研究に格好な疾患モデルである。本研究では RTH と診断され, 知能障害等の重篤な症状を持った患者のゲノム DNA を用いて分子生物学的検討を行った。

T3 レセプター ($TR\beta 1$) の遺伝子解析を行うと, 重複点突然変異が認められ, 451 番目のコドンがストップコドンに変化していた。この異常 $TR\beta 1$ の C 末端 11 アミノ酸の欠失はウエスタンブロットの結果にも合致していた。 $TR\beta 1$ の重複点突然変異は世界で初めての報告である。異常 $TR\beta 1$ を細胞に発現させて検討すると, その T3 結合能及び転写活性が著明に障害されており, さらに, 正常 TR の T3 依存性の転写活性を強く阻害した。また, 異常 $TR\beta 1$ による T3 非存在下におけるプロモーターへの抑制作用は正常 TR に比べて有意に強かった。以上, C 末端の 11 アミノ酸が欠失した異常 $TR\beta 1$ はそれ自身の機能が障害されているのみならず, 正常 TR やプロモーターの機能をも強く阻害し, この症例の臨床症状の重症度を説明するものであった。

以上の研究は TR の作用機構の解明に貢献し, 甲状腺ホルモン不応症の病態の理解に寄与する所が多い。よって本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと思われる。

なお, 本学位授与申請者は, 平成 9 年 1 月 30 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け, 合格と認

められたものである。